

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan sejak bulan Maret 2016 hingga bulan Oktober 2016. Penelitian ini terdiri dari 4 tahap, yaitu (1) ekstraksi biji karabenguk; (2) sintesis Zn-MPn; (3) karakterisasi Zn-MPn dan (4) pengujian katalepsi. Serangkaian tahapan penelitian yang mencakup ekstraksi biji karabenguk dan sintesis Zn-MPn dilaksanakan di Laboratorium Riset (LKR) gedung FPMIPA B, Laboratorium Kimia Organik dan Bahan Alam (LKOB) Universitas Pendidikan Indonesia (UPI) dan Laboratorium Biologi Farmasi Sekolah Farmasi Institut Teknologi Bandung (SF ITB). Karakterisasi Zn-MPn menggunakan instrumen FTIR dan TG-DTA dilaksanakan di Laboratorium Kimia Instrumen (LKI) Universitas Pendidikan Indonesia (FPMIPA UPI). Sedangkan karakterisasi Zn-MPn menggunakan instrumen SEM dan XRD dilaksanakan di *Laboratorium Research Center for Energy and Environmental Science*, Shinshu University Jepang. Pengujian katalepsi dilaksanakan di Laboratorium Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Garut (FMIPA UNIGA).

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

3.2.1 Alat

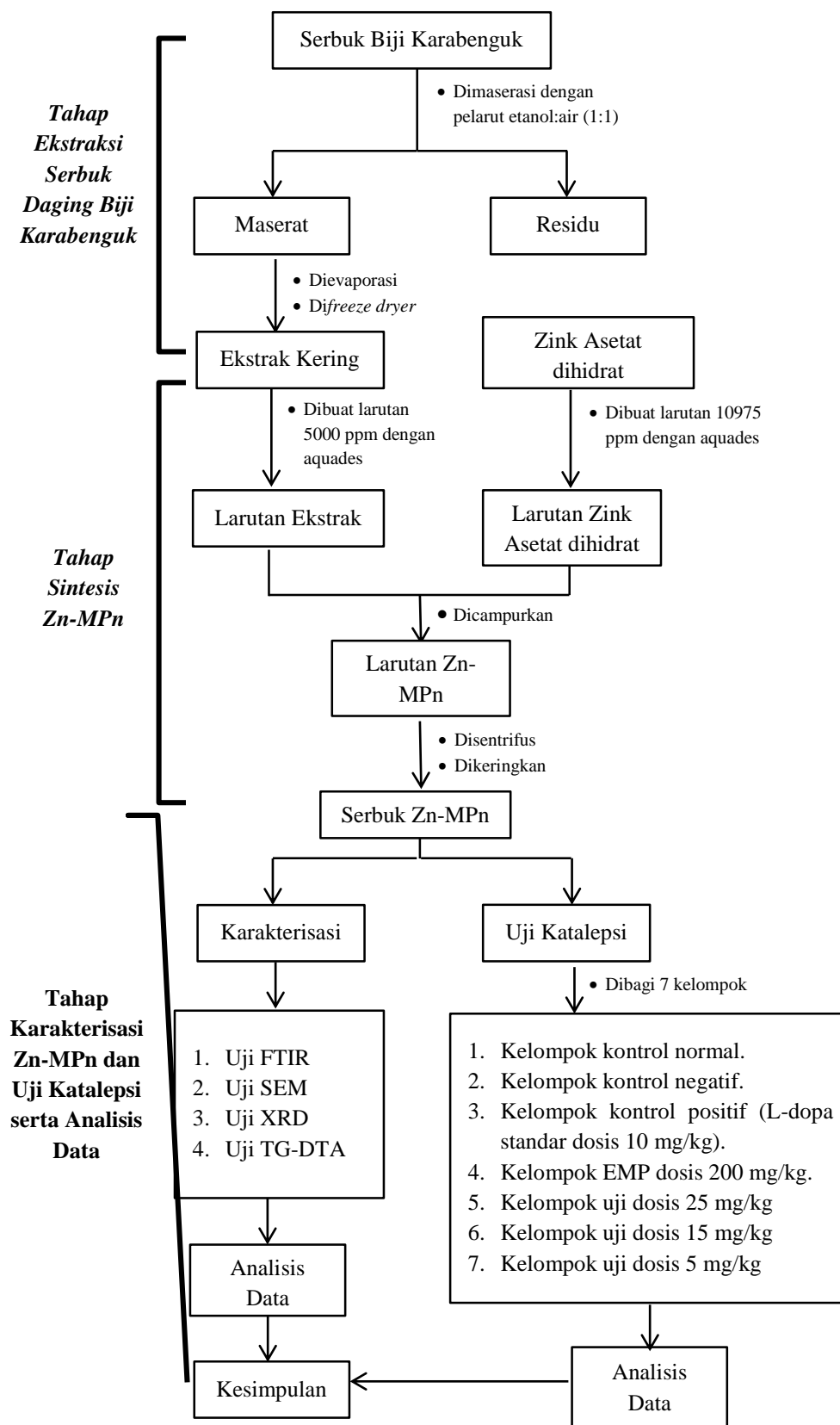
Peralatan yang digunakan pada tahap ekstraksi biji karabenguk dalam penelitian ini meliputi alat-alat gelas, *rotatory evaporator vaccum*, pompa vakum, neraca analitik, corong buchner dan *freeze dryer*. Pada tahap sintesis Zn-MPn, peralatan yang digunakan selain alat gelas adalah *stirrer*, *centrifuge*, dan oven. Sedangkan instrumen yang digunakan untuk karakterisasi Zn-MPn diantaranya, Spektrofotometer *Fourier Transform Infrared* (FTIR), *Scanning Electron Microscopy* (SEM), *X-Ray Diffraction* (XRD) dan *Thermo Gravimetric – Differential Thermal Analysis* TG-DTA. Pada tahap pengujian katalepsi pada mencit, peralatan yang digunakan meliputi sonde, suntikan, spet 3 mL, neraca analitik, labu ukur, lumpang, alu, botol vial, gelas ukur dan kandang polipropilen.

3.2.2 Bahan

Pada tahap ekstraksi bahan-bahan yang digunakan meliputi biji karabenguk (*Mucuna pruriens* var. *utilis* (L.) DC) yang berasal dari Bantul, Yogyakarta, etanol teknis 96%, asam sitrat, aquades, dan kertas saring. Pada tahap sintesis Zn-MPn menggunakan bahan zink asetat dihidrat p.a diperoleh dari Gudang Bahan Sekolah Farmasi ITB, ekstrak *Mucuna pruriens* (EMP), etanol teknis 96% dan aquades. Pada pengujian katalepsi digunakan mencit jantan dan betina dengan berat 20-30 gram sebanyak 21 ekor, pakan mencit berupa PC551, haloperidol, PGA (Poly Glutamic Acid) dan L-dopa standar (3,4-dihidroksi-L-fenilalanin).

3.3 Alur Penelitian

Penelitian ini dilakukan melalui beberapa tahapan, tahapan tersebut mencakup ekstraksi biji karabenguk, sintesis Zn-MPn, karakterisasi hasil Zn-MPn dan uji katalepsi terhadap mencit. bagan alir penelitian penelitian ditunjukkan pada Gambar 3.1.



Gambar 3.1 Bagan Alir Penelitian

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Ekstraksi Biji Karabenguk

Serbuk biji karabenguk (*Mucuna pruriens*) diekstraksi menggunakan pelarut etanol dan air dengan perbandingan 1:1 serta penambahan asam sitrat sampai larutan memiliki pH 3. Teknik ekstraksi yang digunakan adalah ekstraksi cair-padat dengan metode maserasi. Sampel direndam dalam pelarut selama 3 x 24 jam dengan penggantian pelarut baru setiap 24 jam. Maserat diuapkan pelarutnya dengan menggunakan *rotatory evaporator vacuum* hingga diperoleh ekstrak yang lebih pekat, kemudian dengan menggunakan alat *freeze dryer* ekstrak cair dikeringkan sampai didapatkan ekstrak biji karabenguk yang kering.

3.4.2 Sintesis Zn-MPn

Tahapan yang dilakukan untuk sintesis Zn-MPn yang pertama adalah membuat larutan zink asetat dihidrat dengan konsentrasi 0,05 M (10975 ppm) dalam labu ukur 100 mL menggunakan pelarut aquades. Kedua, membuat larutan EMP 5000 ppm yaitu sebanyak 0,5 gram EMP dilarutkan dalam 100 mL aquades lalu diaduk menggunakan *stirrer* hingga larut seluruhnya. Selanjutnya, 100 mL larutan zink asetat dihidrat diaduk secara konstan menggunakan *stirrer* selama 10 menit, kemudian larutan ekstrak ditambahkan sedikit demi sedikit pada larutan zink asetat dihidrat dan diaduk selama 120 menit. Larutan hasil sintesis disentrifugasi pada 2500 rpm selama satu jam. Endapan yang diperoleh dicuci dengan etanol dan dikeringkan dengan menggunakan oven pada suhu 40°C.

3.4.3 Karakterisasi Hasil Sintesis

3.4.3.1 Karakterisasi FTIR

Karakterisi menggunakan FTIR bertujuan untuk menentukan gugus fungsi pada Zn-MPn dan perbedaanya dengan EMP. Alat yang digunakan adalah Shimadzu, pengujian dilakukan pada dua sampel yaitu Zn-MPn dan EMP. Sampel dihaluskan lalu dipadatkan dan dianalisis dalam bentuk pelet KBr. Spektrum direkam dalam daerah bilangan gelombang dari 4000 cm⁻¹ sampai 500 cm⁻¹.

Kemudian hasil spektrum yang diperoleh dibandingkan untuk melihat interaksi yang terjadi antara Zn dengan senyawa aktif pada EMP .

3.4.3.2 Karakterisasi SEM

Karakterisasi menggunakan SEM bertujuan untuk mengetahui gambaran bentuk dan ukuran partikel Zn-MPn. Sampel diletakkan pada wadah sampel kemudian dilihat bentuk morfologinya menggunakan alat FE-SEM JEOL.

3.4.3.3 Karakterisasi XRD

Karakterisasi menggunakan XRD dilakukan untuk mengetahui keberadaan Zn pada Zn-MPn, menentukan kristalinitas Zn-MPn dan rata-rata ukuran partikel Zn-MPn. Sampel Zn-MPn ditempatkan pada wadah sampel dan kemudian diuji menggunakan alat XRD Smartlab Rigaku. Menggunakan $\text{CuK}\alpha$ sebagai sinar X. Ukuran partikel Zn-MPn dapat ditentukan berdasarkan persamaan Scherrer berikut:

$$L = \frac{K\lambda}{\beta \cos \theta}$$

Dimana L adalah ukuran partikel/kristalit, K adalah faktor bentuk dari kristal, β adalah *full width at half maximum* (rad) dan θ adalah sudut difraksi.

3.4.3.4 Karakterisasi TG-DTA

Karakterisasi menggunakan TG-DTA dilakukan untuk mengetahui perubahan fisik dan kimia dari Zn-MPn, serta membandingkan kestabilan termal dari Zn-MPn terhadap EMP. Sampel Zn-MPn atau EMP ditempatkan pada wadah sampel, dengan adanya blanko pada wadah blanko. Perubahan massa akan diukur selama perubahan temperatur, selisih massa sampel dan massa blanko akan diplot dalam bentuk grafik fungsi massa terhadap temperatur. Alat TG-DTA yang digunakan adalah Shimadzu tipe DTG 60H dengan menggunakan gas nitrogen UHP (*Ultra High Purity*).

3.4.4 Uji Aktivitas Katalepsi

3.4.4.1 Preparasi Hewan Uji

Mencit yang digunakan adalah mencit jantan dan betina dengan berat badan 20-30 gram. Mencit dijaga dalam kondisi suhu ruang, dalam kandang

polipropilen dan ditempatkan selama kurang lebih satu minggu untuk beradaptasi dengan kondisi laboratorium. Mencit diberi pakan PC551 dan air mineral. Untuk pengujian katalepsi, mencit didistribusikan secara acak kedalam 7 kelompok yang berbeda dengan 3 ekor mencit dalam setiap kelompok pada kondisi yang sama untuk seluruh percobaan.

3.4.4.2 Preparasi Pemberian dosis

Pada pengujian katalepsi ini, dosis yang digunakan untuk Zn-MPn (hasil sintesis) adalah 5, 15 dan 25 mg/kg berat badan, sedangkan untuk EMP dosis yang digunakan adalah 200 mg/kg berat badan dan L-dopa dosis yang digunakan adalah 10 mg/kg berat badan.

1. Pembuatan sediaan Zn-MPn dosis 25 mg/kg berat badan :

Zn-MPn hasil sintesis sebanyak 25 mg dan PGA sebanyak 100 mg ditimbang dan dicampur dengan menggunakan mortir sambil ditambahkan air sedikit demi sedikit lalu dimasukan ke dalam labu ukur 10 mL, kemudian ditambah air sampai tanda batas dan dihomogenkan.

2. Pembuatan sediaan Zn-MPn dosis 15 mg/kg berat badan:

Zn-MPn dosis 25 mg/kg diambil sebanyak 6 mL kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL dan diencerkan dengan menggunakan air sampai mencapai tanda batas dan dihomogenkan.

3. Pembuatan sediaan Zn-MPn dosis 5 mg/kg berat badan untuk setiap konsentrasi :

Zn-MPn dosis 25 mg/kg diambil sebanyak 2 mL kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL dan diencerkan dengan menggunakan air sampai mencapai tanda batas dan dihomogenkan.

4. Pembuatan sediaan EMP dosis 200 mg/kg berat badan :

EMP sebanyak 200 mg dan PGA sebanyak 100 mg ditimbang dan dicampur dengan menggunakan mortir sambil ditambahkan air sedikit demi sedikit lalu dimasukan ke dalam labu ukur 10 mL, kemudian ditambah air sampai tanda batas dan dihomogenkan.

5. Pembuatan sediaan haloperidol dosis 5 mg/70kg berat badan :

Haloperidol sebanyak 7,8 mg dan PGA sebanyak 100 mg ditimbang dan dicampur dengan menggunakan mortir sambil ditambahkan air sedikit demi sedikit lalu dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL, kemudian ditambah air sampai tanda batas dan dihomogenkan.

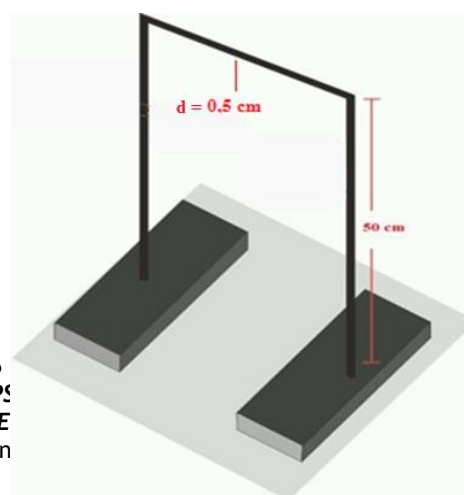
6. Pembuatan sediaan L-dopa dosis 10 mg/kg berat badan :

L-dopa standar sebanyak 10 mg dan PGA 100 mg dicampurkan dan digerus dengan menggunakan mortir sambil ditambahkan air sedikit demi sedikit lalu dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL, kemudian ditambahkan air sampai mencapai tanda batas dan dihomogenkan.

3.4.4.3 Pengujian Katalepsi

Pengujian katalepsi dilakukan dengan cara membagi mencit ke dalam 7 kelompok yaitu kelompok kontrol normal (mencit sehat), kelompok kontrol negatif (mencit yang diinduksi haloperidol), kelompok kontrol positif (mencit yang diberi L-dopa standar dosis 10 mg/kg), kelompok EMP (mencit yang diberi EMP dosis 200 mg/kg), kelompok uji dosis I (mencit yang diberi Zn-MPn dosis 5 mg/kg), kelompok uji dosis II (mencit yang diberi Zn-MPn dosis 15 mg/kg), dan kelompok uji dosis III (mencit yang diberi Zn-MPn dosis 25 mg/kg).

Intensitas katalepsi diukur sebagai lamanya waktu mencit menggantung dengan kedua kaki depan memegang kawat berdiameter 0,5 cm dengan tinggi 50 cm diatas lantai, tanpa melakukan pergerakan. Pengamatan katalepsi dilakukan setelah 60 menit pemberian suspensi haloperidol. Haloperidol dosis 5 mg/kg berat badan diberikan pada mencit 30 menit setelah pemberian L-dopa standar dosis 10 mg/kg atau EMP dosis 200 mg/kg, Zn-MPn (dosis 5 mg/kg, 15 mg/kg dan 25 mg/kg yang diberikan secara oral *disonde*. Skema pengujian katalepsi ditunjukkan pada Gambar 3.2.



Putri Astuti Suganda, 2016
SINTESIS DAN UJI KATALEPSI
pruriens var.utilis) INDONE
Universitas Pendidikan Indon

BENGUK (*Mucuna*
pi.edu

Gambar 3.2 Skema Uji Katalepsi

3.4.5 Analisis Data

Data hasil pengujian katalepsi pada mencit diolah secara statistik menggunakan *one way ANOVA* metode uji Dunnet. Data tersebut dianalisis dengan menggunakan *software SPSS 22*.